

I. Säuren aus Digitalis-Extrakt
II. Über Loroglossin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde vorgelegt
der philosophischen Fakultät II der Universität Zürich

von

ERICH MATTER

aus Kölliken (Aargau)

Begutachtet von Prof. Dr. Paul Karrer

Zürich 1949

Buchdruckerei Jak. Völliger & Cie. — Wädenswil

I. Säuren aus Digitalis-Extrakt
II. Über Loroglossin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde vorgelegt
der philosophischen Fakultät II der Universität Zürich

von

ERICH MATTER

aus Kölliken (Aargau)

Begutachtet von Prof. Dr. Paul Karrer

Zürich 1949

Buchdruckerei Jak. Villiger & Cie. — Wädenswil



Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Meinem sehr verehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. Paul Karrer

spreche ich für sein Wohlwollen und die Förderung, die er mir
und meiner Arbeit stets erwies, meinen herzlichsten Dank aus.

Säuren aus Digitalis-Extrakt

THEORETISCHER TEIL

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, die in Digitalis-Extrakt vorkommenden Pflanzensäuren zu identifizieren. Untersuchungen in dieser Richtung sind schon vor längerer Zeit gemacht worden, erst in neuerer Zeit ist es jedoch gelungen, die einzelnen Säuren zu charakterisieren. Im Folgenden seien die Ergebnisse früherer und eigener Untersuchungen zusammengestellt.

Bisherige Forschungen über Digitalis-Extrakt

Im Jahre 1845 wurde in einer Arbeit von *P. L. Morin*¹ erstmals «l'acide digitalique» beschrieben, ohne aber chemisch identifiziert zu werden.

Erst im Jahre 1928 wurde dann von *P. Bourcet* und *A. Fourton*² die chemische Zusammensetzung dieser Säure abgeklärt. Die beiden Forscher stellten einen Extrakt nach den Angaben von *Morin* her und erhielten nach mehreren Reinigungsprozessen eine kristalline Substanz, welche bei 185° schmolz und die für Bernsteinsäure charakteristischen Reaktionen gab. Die von *Morin* als «l'acide digitalique» bezeichnete Säure war demnach Bernsteinsäure.

P. L. Morin hatte im Digitalis-Extrakt noch eine andere Säure gefunden und ihr den Namen Antirrhinsäure gegeben.

Später war dann das Vorkommen der Antirrhinsäure von mehreren Forschern wiederholt bestätigt worden, ohne dass sich indessen einer um die chemische Aufklärung dieser Substanz bemüht hätte. *A. Fourton*³ hat sich dann im Jahre 1929 mit dieser Säure befasst. Nachdem er festgestellt hatte, dass

sich *Morins* Antirrhinsäure in Aether aufnehmen liess, stellte er einen Aether-Extrakt von frischen Digitalisblättern her. Den Rückstand des eingedampften Extraktes unterwarf er einer Wasserdampfdestillation, schüttelte das Destillat mit Aether aus und gewann so eine saure Flüssigkeit mit aromatischem Geruch. Durch fraktionierte Destillation liess sich diese in mehrere Fraktionen aufteilen, aus welchen er dann Isovaleriansäure, n-Buttersäure, Essigsäure und Ameisensäure isolieren konnte. Er vermutete ferner noch Propionsäure, doch konnte er diese wegen der geringen Menge nicht mit genügender Sicherheit nachweisen.

Morins Antirrhinsäure stellte also in Wirklichkeit ein Gemisch mehrerer Säuren dar.

Im Jahre 1827 schrieben *Brault* und *Poggiale*⁴ in einer Arbeit, welche sich auf Digitalin bezog, dass in einem Extrakt aus Digitalispflanzen Gallussäure und Tannin enthalten sei. Strenge Beweise für das Vorkommen dieser Stoffe lagen indessen nicht vor, obwohl auch andere Forscher Tannin als Bestandteil von Digitalis-Extrakt erwähnt hatten.

Die schon oben zitierten Forscher *P. Bourcet* und *A. Fourton*⁵ untersuchten im Jahre 1929 Extrakt aus frischen Digitalisblättern auf den Gehalt an Gallussäure und Tanninsubstanzen. Sie stellten einen wässerigen Auszug her, der mit Eisenchlorid eine grüne Farbreaktion gab, aber keine der für Gallussäure charakteristischen Reaktionen zeigte. Durch Zusatz von Zink-Acetat wurde ein Niederschlag ausgefällt, der mit Oxalsäure wieder zersetzt wurde. Vom Zinkoxalat wurde abgenutscht und aus dem Filtrat ein Rückstand gewonnen, der sich in Methanol lösen liess und bei Zusatz von Aether einen flockigen Niederschlag bildete. Die filtrierte Lösung ergab beim Eindampfen einen Rückstand, der Fehling'sche Lösung reduzierte und mit Eisenchlorid eine grüne Farbreaktion gab. Durch mehrmaliges Umkristallisieren wurden gelbe Kristalle erhalten, die als Kaffeesäure identifiziert werden konnten.

Nach dieser Untersuchung sind im Digitalis-Extrakt weder Gallussäure, noch Substanzen der Tanningruppe enthalten, sondern lediglich Kaffeesäure.

Der Amerikaner *A. John Schwarz*⁶ veröffentlichte eine Arbeit über die Untersuchung der in Digitalispflanzen vorkommenden Fettsubstanzen.

Er stellte durch Extraktion mit Petroläther einen Auszug her, welcher die Pflanzenfette enthielt. Die Fette wurden mit alkoholischer Lauge verseift, wobei etwa 35 % unverseifbares Material erhalten wurde. Die mit Schwefelsäure freigemachten Fettsäuren wurden mit Aether extrahiert, während aus der wässerigen Lösung Glycerin isoliert wurde.

Mit Bleiacetat wurden die Fettsäuren ausgefällt und die Bleisalze, entsprechend ihrer Löslichkeit in Alkohol, in vier Fraktionen aufgeteilt. In diesen Fraktionen konnten folgende Säuren nachgewiesen werden: Palmitinsäure, Myristinsäure, Linolensäure, Linolsäure und Oelsäure.

Aus der Fraktion der unverseifbaren Substanzen konnten Melissylalkohol, Sitosterol und Triacontan isoliert werden.

Dies sind die Arbeiten, die bisher über dieses Gebiet veröffentlicht wurden.

Ergebnisse eigener Untersuchungen

Für unsere Untersuchungen stand ein Extrakt aus Digitalispflanzen zur Verfügung, der von der Firma Hoffmann-La Roche auf folgende Weise hergestellt worden war:

Die Substanzen waren mit Aether extrahiert und an Tierkohle adsorbiert worden, aus welcher sie dann wieder mit Wasser eluiert wurden. Mit Ammoniak wurde die wässrige Lösung neutralisiert und im Vakuum zur Trockene eingengt. Der so erhaltene Trockenrückstand bildete das Ausgangsmaterial für unsere Untersuchungen.

Der Trockenrückstand war ein dunkelbraunes, etwas klebriges Pulver von schwachem Geruch, dessen Gesamtmenge 1,25 kg betrug

Wir verwendeten für einen Vorversuch 250 g, um nachher die Untersuchung mit einem Ansatz von 1 kg Extrakt durchzuführen.

Bei der Aufarbeitung gingen wir so vor, dass wir durch verschiedene Extraktionen die Substanzen einmal ganz roh auf-trennten und dann die erhaltenen Fraktionen gesondert auf-arbeiteten.

Wir erhielten folgende drei Hauptfraktionen:

1.

Die wässrige Lösung der Ammonsalze wurde im Soxhlet-Apparat mit Aether extrahiert. Dieser Aether-Extrakt enthielt neutrale Substanzen, Phenole und Säuren.

Durch Ausschütteln mit Na-Bicarbonat- und Sodalösung trennten wir die Säuren und Phenole von den Neutralsubstanzen ab. Wir erhielten so die mit A (Neutralsubstanzen), B (Phenole und C (Säuren) bezeichneten Fraktionen.

Aus der Fraktion A konnten wir einen Geruchstoff (A 125) isolieren. Die Menge der erhaltenen Substanz betrug jedoch nur einige Milligramm und es war nicht möglich, die Substanz zu identifizieren.

Aus der Fraktion B konnte ebenfalls in äusserst geringer Menge ein Geruchstoff (B 90) abgetrennt werden. Neben diesem Geruchstoff konnten im Hochvakuum gelbe Kristalle sublimiert werden, welche nach zweimaligem Umkristallisieren bei 198—202° schmolzen. Durch Farbreaktion und Analyse, sowie durch einen Mischschmelzpunkt wurde die Substanz als Kaffeesäure identifiziert.

In der Fraktion C liessen sich Ameisensäure und Essigsäure als Bromphenacyl-ester nachweisen.

Im weiteren isolierten wir Bernsteinsäure, sowie eine mit C 85 bezeichnete Säure.

Die Säure C 85 besitzt einen angenehmen Geruch und stellt in wasserfreiem Zustand einen dicken, fast farblosen Sirup dar. Die Analyse eines hergestellten Benzylthiuroniumsalzes ergab, dass der Säure die Formel $C_8H_{14}O_6$ zukommt, wobei diese Summenformel zwei Carboxylgruppen, eine Methoxylgruppe und wahrscheinlich eine Hydroxylgruppe enthält.

Wir vermuteten, dass es sich um eine Oxy-methoxy-pimelinsäure handle.

Wir haben die Säure mit Diazomethan verestert und die Analyse des erhaltenen Dimethylesters stimmte gut mit den berechneten Werten überein. Aus dem Ester versuchten wir das Säureamid herzustellen, um dann mit Hilfe der *Weermannschen* Reaktion⁷ die Lage der hypothetischen Hydroxylgruppe zu ermitteln. Der Ester wurde in alkoholischer Lösung mit trockenem Ammoniak versetzt. Die Umsetzung dauerte jedoch aussergewöhnlich lange und wir erhielten als Produkte Bernsteinsäurediamid und ein gelbes Oel. Bei der Reaktion mit Ammoniak muss eine Zersetzung stattgefunden haben.

2.

Die wässrige Restlösung der obigen Extraktion wurde mit Salzsäure angesäuert und die in Freiheit gesetzten Pflanzensäuren im Soxhlet-Apparat mit Aether extrahiert.

Aus diesen mit F 1 und F 2 bezeichneten Extrakten wurde die reichlich vorkommende Bernsteinsäure durch fraktionierte Kristallisation möglichst entfernt.

Der Rückstand, eine braune Masse, wurde mit Methanol verestert und die Ester durch fraktionierte Destillation im Hochvakuum aufgetrennt.

In den Destillaten konnte neben der bereits erwähnten Bernsteinsäure Milchsäure, Citronensäure und Isocitronensäure nachgewiesen werden.

Die Milchsäure wurde durch das bei 74° schmelzende Amid charakterisiert.

Citronensäure haben wir im Destillat als kristallinen, bei 78° schmelzenden Citronensäuretrimethylester erhalten. Die Charakterisierung erfolgte durch Analyse und Mischschmelzpunkt, sowie durch Verseifung des Esters und Gewinnung der freien Citronensäure.

Aus den höhersiedenden Destillaten der Ester wurde eine in feinen Nadeln kristallisierende Substanz erhalten. Der Schmelzpunkt dieser Kristallnadeln lag bei 107°. Die Analysenwerte stimmten für die Formel $C_6H_4O_4(OCH_3)_2$, wobei eine Molegewichtsbestimmung den Wert 207 gab.

Durch Verseifung wurde eine feste, glasige Masse erhalten, welche erst nach langem Trocknen im Trockenapparat kristallin wurde und nach mehrmaligem Umkristallisieren bei 159—161° schmolz. Die Analyse ergab die Werte $C_6H_6O_6$. Es handelte sich hier um das Lacton der Isocitronensäure.

Aus dem Dimethylester des Isocitronensäurelactons konnte durch Umsetzung mit trockenem Ammoniak das Diamid des Isocitronensäurelactons gewonnen werden. Diese Verbindung hatte einen Schmelzpunkt von 203—204°.

Isocitronensäure wurde erstmals im Jahre 1925 von *E. K. Nelson*⁸ in der Natur aufgefunden und zwar in Brombeerblättern, in denen sie reichlich vorkommt. Weiter wurde sie auch in den Früchten von *Couroupita guianensis*⁹, dann in Kartoffeln¹⁰, in *Bryophyllum calycinum*¹¹, sowie in Crassulaceen nachgewiesen.

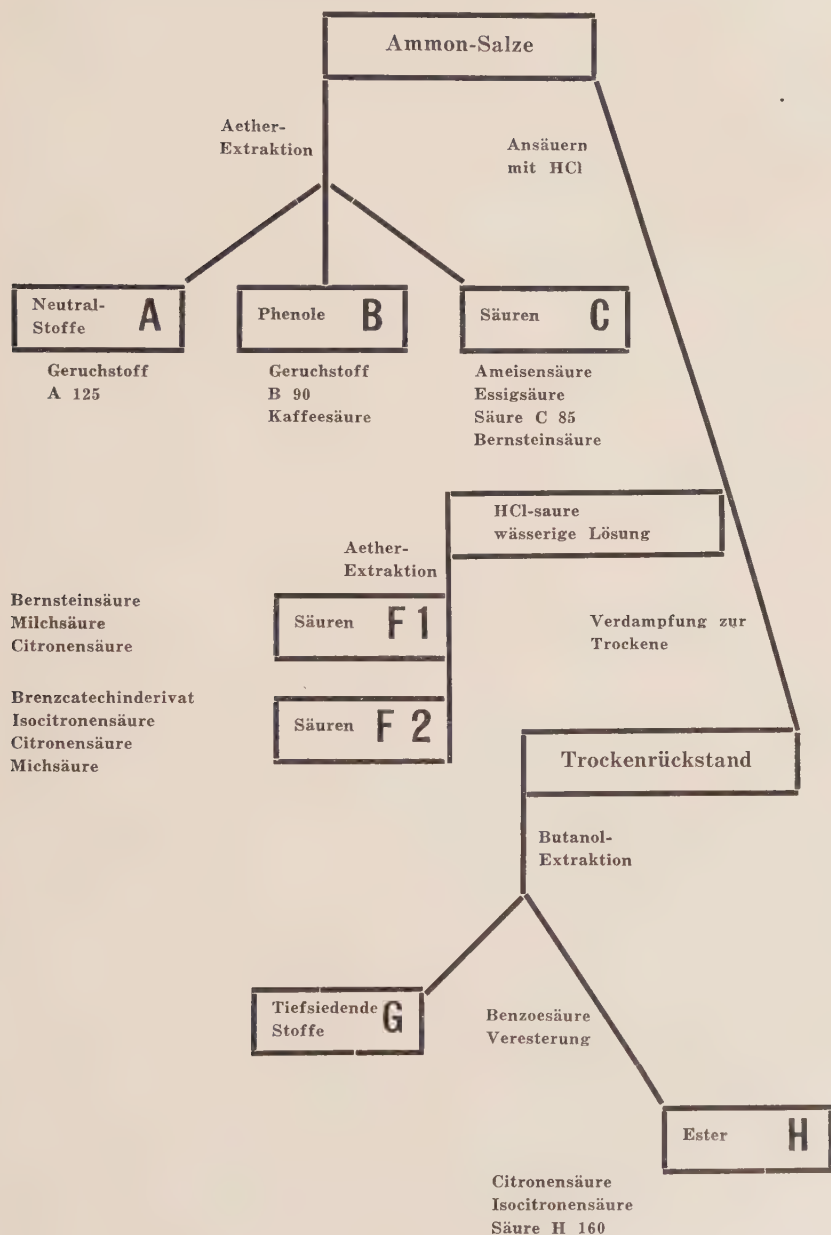
3.

Nach der Aetherextraktion wurde die saure, wässrige Lösung im Vakuum zur Trockene eingengt und der Rückstand mit Butanol bei einem Druck von 30—40 mm extrahiert.

Wir versuchten die Substanzen im Hochvakuum aus einem Kugelrohr zu destillieren, doch erfolgte schon bei einer Temperatur von 150° Zersetzung, nachdem erst ein geringer Teil der Substanz überdestilliert war.

Aus dem Destillat konnte Benzoesäure isoliert werden. Da sich der Hauptanteil der Säuren nicht destillieren liess, so stellten wir destillierbare Methylester her. Aus dem Gemisch der Ester konnten wir Citronensäure und Isocitronensäure gewinnen. Daneben wurde noch eine Säure (H 160) isoliert, deren Methylester im Hochvakuum unter 0,002 mm Druck bei 160—170° überging. Nach der Verseifung des Esters versuchten wir die Säure, einen dicken, zähflüssigen Sirup, auf dem Wege über das Ca-Salz zu reinigen. Das Ca-Salz war in heissem Wasser schwerer löslich als in kaltem Wasser. Die freie Säure wollte auch nach längerem Trocknen im Trockenapparat nur teilweise kristallisieren. Eine weitere Reinigung konnte aber wegen zu geringer Substanzmenge nicht durchgeführt werden.

Aufarbeitungsschema des Digitalis-Extraktes



Wir haben somit in dem Extrakt zwei Geruchstoffe, A 125 und B 90, Kaffeesäure, Ameisensäure, Essigsäure, Milchsäure, Bernsteinsäure, Citronensäure, Isocitronensäure und Benzoesäure nachweisen können. Daneben haben wir die beiden Säuren C 85 und H 160, welche nicht identifiziert werden konnten, isoliert.

Rein mengenmässig trat in unserem Extrakt vor allem die Bernsteinsäure hervor. Dann folgten in grossem Abstand Citronensäure und Isocitronensäure, während die anderen Substanzen nur in geringer Menge vorlagen.

EXPERIMENTELLER TEIL

EXTRAKT I

1030 g Digitalis-Extrakt (Ammonsalze) wurden in ca. 4 Liter Wasser gelöst und während 12 Tagen im Soxhlet-Apparat mit Aether extrahiert.

Die gelbbraune Aetherlösung hinterliess beim Einengen einen braunen Rückstand, der zum Teil kristallin erstarrte und 14,5 g wog.

Ein Versuch zeigte, dass die wässrige Lösung dieser Substanzen sauer reagierte und mit Eisenchlorid eine grüne Farb-reaktion gab.

Isolierung der Bernsteinsäure

Wir nahmen die braune Masse nochmals in Aether auf, engten ein und stellten die Lösung in den Eisschrank, wo sich nach einigen Tagen gelbe Kristalle abschieden.

Die so erhaltenen Kristalle wurden in verdünntem Alkohol aufgenommen, die Lösung mit Tierkohle gekocht, filtriert und eingeeengt.

Nach zweimaligem Umkristallisieren erhielten wir 4,2 g farblose, körnige Kristalle, deren Schmelzpunkt bei 184° lag. Die Kristalle lösten sich leicht in Wasser und gaben mit Eisenchlorid keine Färbung.

Im Hochvakuum sublimierten die Kristalle bei 0,03 mm Druck und einer Luftbadtemperatur von 125—135°.

Durch Analyse wurden folgende Werte erhalten:

C 40,46 %, H 4,97 %.

Ein Mischschmelzpunkt mit Bernsteinsäure ergab keine Depression.

Aufarbeitung des Extraktes.

Nachdem aus der obigen ätherischen Lösung durch fraktionierte Kristallisation die Bernsteinsäure möglichst entfernt worden war, wurde der Aether wegdestilliert und wir erhielten als Rückstand eine braune, ölige Masse von 10,4 g Gewicht. Der wieder in Aether aufgenommene Rückstand wurde dann zur Entfernung der Säuren dreimal mit Natrium-Bicarbonatlösung ausgeschüttelt und hierauf die Phenole durch Ausschütteln mit Sodalösung entfernt. In der ätherischen Lösung blieben die neutralen Substanzen zurück.

Wir hatten auf diese Art drei Fraktionen erhalten, die wie folgt bezeichnet wurden:

- A Neutrale Substanzen
- B Phenole
- C Säuren

A. Neutrale Substanzen

Beim Einengen der ätherischen Lösung hinterblieb ein brauner Rückstand, der einen eigenartigen Geruch besass und 0,53 g wog.

Wir destillierten die Substanzen aus einem kleinen Kugelrohr im Hochvakuum (0,03 mm Druck) und erhielten folgende Fraktionen:

- 70— 90° Gelbes Oel + Kristalle
Geringe Menge
- 110—140° Gelbes Oel mit aromatischem Geruch
Hauptmenge
Brauner Rückstand

Das bei 110° übergegangene Oel wurde in 5 ccm Aether aufgenommen und die Lösung mit 1 normaler Natronlauge dreimal ausgeschüttelt.

Die in der Lauge gelösten Substanzen wurden nach dem Ansäuern mit Salzsäure wieder mit Aether ausgeschüttelt und anschliessend im Hochvakuum aus einem kleinen Kugelrohr destilliert. Nach einem geringen Vorlauf ging bei 125—135° ein gelbes Oel (Bezeichnung A 125) über, welches teilweise kristal-

lin erstarrte und einen angenehmen aromatischen Geruch besass. Das Präparat war aber noch uneinheitlich und wurde wegen der geringen Menge nicht mehr weiter untersucht.

B. Phenole

Nach dem Ausschütteln mit Soda wurde die alkalische Lösung sofort mit Salzsäure angesäuert und die Phenole mit Aether ausgeschüttelt.

Der Aether enthielt ein braunes Oel, welches einen starken aromatischen Geruch besass und 1,7 g wog.

Die wässrige Lösung reagierte sauer und gab mit Eisenchlorid eine grüne Farbreaktion.

Wir unterwarfen das Oel einer Hochvakuumdestillation und erhielten dabei folgende Fraktionen:

- | | |
|----------|---|
| 90—100° | Gelbes Oel in geringer Menge.
Eigenartiger, starker Geruch |
| 140—170° | Braunes Oel, Hauptmenge |
| 180° | Zersetzung
Dunkelbrauner Rückstand |

Die bei 140—170° übergangene Substanz wurde ein zweitesmal destilliert und konnte in die folgenden Fraktionen aufgetrennt werden:

- | | |
|----------|---|
| 100—125° | Gelbes Oel in geringer Menge |
| 160—165° | Gelbbraunes Oel. Erstarrt nach einigen Stunden zu einem Kristallbrei. |

Während das bei 100° übergangene Oel mit Eisenchlorid keine Farbreaktion gab, zeigte die Fraktion B 160 mit Eisenchlorid eine dunkelgrüne Färbung, die bei Zusatz von Soda über Blau nach Rot umschlug.

Isolierung der Kaffeesäure

Die Kristallmasse der Fraktion B 160 wurde in heissem Benzol aufgenommen, die Lösung mit Tierkohle gekocht, filtriert und eingeengt.

Es schieden sich gelbe Kristalle ab, die nach zweimaligem Umkristallisieren bei 198—202° schmolzen. Aus der Mutter-

lauge wurde noch eine geringe Menge von Kristallen erhalten, die unscharf bei 85—100° schmolzen.

Die bei 198—202° schmelzenden Kristalle gaben die für die Brenzcatechinderivate charakteristische Farbreaktion. Sie lösten sich leicht in Alkohol und schwer in Wasser mit saurer Reaktion.

Mit Schwefelsäure gaben die Kristalle eine gelbe Färbung, welche nach einiger Zeit in braunrot umschlug.

Die Analyse führte zu folgenden Werten:

C 59,43 %, H 4,32 %, OCH_3 —.

Für die Formel $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$ berechnen sich:

C 60,00 %, H 4,44 %

Schmelzpunkt, Analyse, sowie die Farbreaktionen deuteten auf Kaffeesäure hin.

Ein Mischschmelzpunkt mit reiner Kaffeesäure ergab keine Depression.

C. Säuren

Die mit Natrium-Bicarbonatlösung ausgeschüttelten Säuren wurden mit Salzsäure freigemacht und mit Aether ausgeschüttelt. Der Rückstand der eingeengten Aetherlösung, ein braunes Oel, wog 7,6 g.

Isolierung von Ameisensäure und Essigsäure

Bei einem Vakuum von 40 mm wurden die tiefsiedenden Säuren aus einem Kugelrohr abdestilliert. Wir erhielten eine farblose Flüssigkeit, die bei 70—80° überdestillierte und einen stechenden Geruch besass. Die erhaltene Menge betrug 750 mg. Die Flüssigkeit mischte sich mit Wasser in jedem Verhältnis und reagierte sauer.

Silbernitrat und Permanganat wurden reduziert.

Um die Säuren zu identifizieren wurde die Flüssigkeit mit p-Bromphenacylbromid umgesetzt:

350 mg der obigen Flüssigkeit wurden mit 1 normaler Natronlauge titriert, wobei man 5,20 ccm Lauge verbrauchte. Als Indikator diente Phenolphthalein.

5,2.10⁻³ äq. Lauge entsprechen 1,44 g p-Bromphenacylbromid. Die wässrige Lösung der neutralisierten Säuren wurde im Vakuum zur Trockene verdampft und das Natrium-Salz dreimal mit absolutem Aether ausgekocht.

Das trockene Natrium-Salz haben wir in 8 ccm abs. Alkohol suspendiert und mit einem Tropfen verdünnter Salzsäure versetzt. Hierauf hat man zur Lösung 1,45 g p-Bromphenacylbromid zugefügt, die Mischung eine Stunde unter Rückfluss erhitzt, vom abgeschiedenen Natrium-Bromid abgenutscht und Wasser bis zur Trübung zugegeben.

In kurzer Zeit begannen sich farblose Kristalle abzuscheiden, die aus einem Gemisch von Benzol-Petroläther umkristallisiert wurden.

Durch fraktionierte Kristallisation erhielten wir folgende vier Fraktionen:

Fraktion 1	Smp. 83—84°
Fraktion 2	Smp. 81°
Fraktion 3	Smp. 76°
Fraktion 4	Smp. 98°

Die Fraktionen 1 und 4 wurden getrennt mehrmals umkristallisiert. Fraktion 1 umfasste die Hauptmenge, während die Fraktion 4 kleiner war.

Fraktion 1:

Nach dreimaligem Umkristallisieren schmolzen die farblosen Blättchen bei 85°. Es handelte sich hier um den p-Bromphenacyl-ester der Essigsäure.

Fraktion 4:

Nach dreimaligem Umkristallisieren lag der Schmelzpunkt der feinen, farblosen Nadelchen bei 132°.

Ein Mischschmelzpunkt mit dem p-Bromphenacylester der Ameisensäure ergab keine Depression.

Höhersiedende Säuren

Die höhersiedenden Säuren wurden aus einem Kugelrohr im Hochvakuum destilliert. Wir erhielten bei einem Druck von 0,04 mm folgende Fraktionen:

80— 85°	Farbloses Oel mit angenehmem, honigartigem Geruch	
	Menge 1,23 g	C 85
95—100°	Farblose Flüssigkeit. Wird bei längerem Stehen an der Luft rötlich	C 100
125—130°	Farblose Kristalle	C 125
135°	Beginn der Zersetzung.	
	Rückstand: Dunkelbraunes, dickes Oel.	

Die erhaltenen Destillate haben wir gesondert untersucht, während man den Rückstand zur Gewinnung destillierbarer Ester mit Diazomethan veresterte.

Fraktion C 85

Das Oel wurde nochmals im Hochvakuum destilliert und ging bei 85° über.

Es löste sich in Wasser mit saurer Reaktion und gab mit Eisenchlorid eine schwach gelbbraune Färbung.

Bei der Analyse wurden folgende Werte erhalten:

C 48,63 %, H 7,63 % OCH_3 14,80 %

Um die Säure zu identifizieren stellten wir ein Benzylthiuroniumderivat her.

Benzylthiuroniumderivat:

0,409 g Säure wurden in 2 ccm Wasser gelöst und mit 1 normaler Kalilauge neutralisiert. Als Indikator diente Phenolphthalein, verbraucht wurden 4,40 ccm 1 normale Lauge. Die wässrige Lösung hat man im Vakuum zur Trockene verdampft und den Rückstand, warzige Kristalle, im Trockenapparat 5 Stunden bei 60° getrocknet.

Das trockene Kalium-Salz wurde dreimal mit abs. Aether ausgekocht, in 3 ccm Wasser aufgenommen und 1 Tropfen verdünnte Salzsäure zugefügt. Unter Eiskühlung setzte man eine gesättigte wässrige Lösung von 0,900 g Benzylthiuroniumchlorid hinzu, wobei sich sofort ein weisser, körniger Niederschlag abschied. Nachdem das Reaktionsgemisch eine Nacht im Eisschrank gestanden hatte, wurden die Kristalle abgenutscht, mit etwas Eiswasser gewaschen und im Trockenapparat vier Stunden bei 60° getrocknet.

Das trockene, weisse Pulver haben wir in 6 ccm heissem abs. Alkohol gelöst, die Lösung heiss filtriert und in den Eisschrank gestellt.

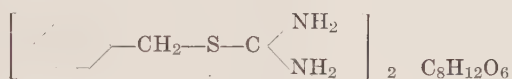
Nach zweimaligem Umkristallisieren schmolzen die Kristalle bei 146,5°.

Die Analyse dieses Präparates ergab:

C 53,67 %, H 6,32 %, N 10,62 %, OCH₃ 5,58 %

Die erhaltenen Werte stimmen sehr gut auf die Formel C₂₄H₃₄N₄S₂O₆, wobei auf diese Summenformel eine Methoxylgruppe entfällt:

C 53,54 %, H 6,32 %, N 10,40 %, OCH₃ 5,67 %



Der freien Säure muss somit die Formel C₈H₁₄O₆ zukommen. Ferner muss die Säure zweibasisch sein, eine Methoxylgruppe und wahrscheinlich eine Hydroxylgruppe enthalten.

Die Formel würde stimmen auf eine Oxy-methoxy-pimelinsäure.

Wir stellten nun durch Veresterung mit Diazomethan den Dimethylester der Säure her, um aus diesem das Säureamid zu erhalten.

Methylester:

Aus Nitrosomethylharnstoff wurde eine ätherische Lösung von Diazomethan bereitet und durch Titration festgestellt, dass 100 ccm Lösung 0,12 äq. Diazomethan enthielten.

850 mg Säure haben wir in wenig Aether aufgenommen, unter Eiskühlung mit 7 ccm Diazomethanlösung versetzt und das Ganze gut geschüttelt. Die Aetherlösung wurde nach Beendigung der Reaktion eingengt und der Rückstand aus einem kleinen Kugelrohr destilliert.

Bei einem Druck von 20 mm wurden folgende Fraktionen erhalten:

80— 90° Farbloses Oel in geringer Menge
Geruch wie Amylacetat

95—100° Farbloses Oel mit schwachem Geruch

Menge: 770 mg

Die Analyse des erhaltenen Esters ergab:

C 51,48 %, H 7,27 %

Die für die Formel $C_{10}H_{18}O_6$ berechneten Werte lauten:

C 51,28 %, H 7,68 %

Säureamid:

Der Ester wurde in einer Lösung von abs. Alkohol mit trockenem Ammoniak umgesetzt. Man löste 770 mg Ester in 6 ccm abs. Alkohol, sättigte die Lösung bei Zimmertemperatur mit trockenem Ammoniak und engte sie nach drei Tagen im Vakuum ein.

Als Rückstand blieb ein gelbes Oel mit winzigen Kristallkeimen.

Wir versetzten nochmals mit abs. Alkohol und sättigten die Lösung während 8 Tagen wieder mit trockenem Ammoniak. Nach dieser Zeit begannen sich farblose Kristalle abzuscheiden. Die abgenutzten Kristalle wurden zweimal aus Methanol umkristallisiert. Sie schmolzen bei 243°.

Die Analyse ergab die Werte:

C 41,69 %, H 6,86 %, N 24,12 %, OCH_3 —

Schmelzpunkt und Analysenwerte stimmen auf Bernstein-säurediamid.

Es scheint somit, dass sich die Substanz bei der Umsetzung mit Ammoniak zersetzt hat.

Aus der alkoholischen Mutterlauge erhielt man beim Einengen im Vakuum als Rückstand ein gelbes Oel, welches bei 12 mm Druck aus einem Kugelrohr destilliert wurde.

Bei 100° ging ein farbloses Oel über, dessen Analyse folgende Werte ergab:

C 55,64 %, H 7,92 %

Fraktion C 100

Das farblose Oel, welches sich bei längerem Stehen an der Luft rötlich färbte, wurde ein zweites Mal aus einem kleinen Kugelrohr destilliert. Die erhaltene Menge betrug 60 mg.

Die Analyse ergab:

C 49,44 %, H 7,07 %, OCH₃ 18,79 %

Die wässrige Lösung reagierte sauer und zeigte mit Eisenchlorid eine schwach gelbbraune Färbung.

Fraktion C 125

Die Kristalle wurden nochmals sublimiert und schmolzen dann bei 184°. Ein Mischschmelzpunkt mit Bernsteinsäure ergab keine Depression.

EXTRAKT II

Die wässrige Lösung der Ammonsalze wurde mit Salzsäure stark angesäuert und die freigewordenen Pflanzensäuren im Soxhlet-Apparat während 14 Tagen mit Aether extrahiert. Den so erhaltenen Extrakt bezeichneten wir als Extrakt F 1. Anschliessend wurde die wässrige Lösung nochmals 14 Tage mit Aether extrahiert (Extrakt F 2).

Fraktion F 1

Die Aetherlösung wurde eingeeengt und nach einigen Tagen die abgeschiedene Bernsteinsäure abgenutscht. Wir erhielten 9,7 g Bernsteinsäure.

Nun haben wir das Lösungsmittel vollkommen wegdestilliert, wobei als Rückstand ein dickflüssiges, braunes Oel übrigblieb.

1 g dieses Oels wurde versuchsweise im Hochvakuum destilliert. Es zeigte sich jedoch, dass sich das Oel nur zu einem kleinen Teil destillieren liess, indem schon bei 135° Zersetzung eintrat.

Wir stellten deshalb destillierbare Ester her, um die einzelnen Ester durch fraktionierte Destillation zu trennen.

Veresterung

Die Pflanzensäuren wurden im Trockenapparat 14 Stunden bei 80° getrocknet. Der Rückstand, eine braune, feste Masse, wog 76,5 g.

Wir erhitzten die Säuren mit 600 ccm abs. Methanol und 15 ccm Schwefelsäure während 8 Stunden unter Rückfluss. Nach dem Abkühlen wurde mit Natrium-Bicarbonat neutralisiert, der Niederschlag abgenutscht und das Methanol im Vakuum abgedampft. Die Ester haben wir in 1,5 Liter Aether aufgenommen, die Lösung filtriert und eingeeengt, wobei ein braunes Oel im Gesamtgewicht von 67,5 g zurückblieb.

Das Oel löste sich ein wenig in Wasser mit schwach saurer Reaktion und gab mit Eisenchlorid eine olivgrüne Färbung. Wir trennten die Ester durch fraktionierte Destillation und erhielten bei einem Druck von 20 mm folgende Fraktionen:

60—65°	Farblose Flüssigkeit	F 1 65
	Geruch wie Milchsäureester	
	Menge: 1,3 g	
75—80°	Farblose Flüssigkeit	
	Menge: 1,6 g	
90°	Farblose Flüssigkeit	F 1 90
	Erstarrt beim Abkühlen auf —10°	
	Menge: 8,3 g	

Die höhersiedenden Ester wurden im Hochvakuum bei einem Druck von 0,04 mm destilliert.

115°	Gelbliches, geruchloses Oel	
	Menge: 9,6 g	
117—120°	Gelbliches Oel. Erstarrt kristallin	F 1 117
	Menge: 9,2 g	
125—130°	Gelbliches, dickes Oel	
	Erstarrt teilweise kristallin	
	Menge: 5,2 g	
130—135°	Dickes, gelbes Oel	
	Menge: 1,3	
140°	Beginn der Zersetzung	
	Brauner Rückstand	

Isolierung der Milchsäure

Die Fraktion F 65 wurde nochmals destilliert, wobei die Hauptmenge bei einem Druck von 20 mm bei 55° überging. Die farblose Flüssigkeit war wasserlöslich mit schwach saurer Reaktion.

Die Analyse ergab folgende Werte:

C 46,08 %, H 7,04 %, OCH_3 36,39 %

Zur Isolierung der Säure verseiften wir 500 mg des Esters mit 6 ccm 2 normaler Natronlauge bei 50°. Die alkalische Lösung wurde nach 5 Stunden mit Salzsäure angesäuert, mit Aether ausgeschüttelt und die mit Na_2SO_4 getrocknete Aetherlösung eingengt. Als Rückstand blieb eine farblose Flüssigkeit mit Kristallkeimen.

Wir destillierten die Flüssigkeit im Hochvakuum aus einem kleinen Kugelrohr.

65—75° Farbloses Oel

Hauptmenge

125—140° Farblose Kristalle

Bernsteinsäure

Die Analyse des Oeles ergab:

C 37,61 %, H 7,04 %, OCH_3 —

Aus diesem Ester stellten wir durch Umsatz mit trockenem Ammoniak das Amid her.

900 mg Ester wurden in 5 ccm abs. Alkohol aufgenommen und die Lösung mit trockenem Ammoniak gesättigt. Nach 48 Stunden wurde die Lösung im Vakuum eingengt. Der Rückstand, eine fast farblose Flüssigkeit, erstarrte beim Kratzen mit einem Glasstab zu einem Kristallbrei. Die Kristallmasse wurde in wenig Alkohol aufgenommen, mit etwas Tierkohle ausgekocht, die Lösung filtriert, eingengt und im Eisschrank der Kristallisation überlassen.

Die farblosen Kristalle haben wir noch dreimal aus Alkohol-Aether umkristallisiert. Sie schmolzen dann bei 73—74°. Ein Mischschmelzpunkt mit Milchsäureamid ergab keine Depression.

Fraktion F 1 90

Nachdem die Flüssigkeit ein zweites Mal destilliert worden war, erstarrte sie beim Abkühlen kristallin und schmolz bei 13°.

Die Analyse ergab folgende Werte:

C 49,11 %, H 6,71 %, OCH_3 43,46 %

Diese Werte stimmen für die Formel $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$: Bernsteinsäuredimethylester.

Isolierung der Citronensäure

Die zu einem Kristallbrei erstarrte Fraktion F 117 wurde in Aether aufgenommen, mit etwas Tierkohle gekocht, filtriert, zur Hälfte eingeeengt und mit Petroläther bis zur Trübung versetzt. Nach einigem Stehen hatten sich farblose, prismenförmige Kristalle abgeschieden.

Die Kristalle wurden noch zweimal aus Aether-Petroläther umkristallisiert und schmolzen bei 78°.

Eine Analyse ergab folgende Werte:

C 45,89 %, H 6,46 %, OCH₃ 38,09 %

Diese Zahlen entsprechen der Formel C₆H₅O₄(OCH₃)₃. Formel und Schmelzpunkt stimmen mit den Werten für Citronensäuretrimethylester überein.

Ein Mischschmelzpunkt mit Citronensäuretrimethylester ergab keine Depression.

Die übrigen Esterfraktionen aus dem Extrakt F 1 stellten, wie sich bei der Untersuchung ergab, Gemische von Estern dar

Fraktion F 2

Beim Einengen der gelben Aetherlösung blieb als Rückstand ein braunes Oel zurück, das wir wie die Fraktion F 1 mit Methanol veresterten.

Die Ester wurden fraktioniert destilliert. Wir erhielten bei einem Druck von 20 mm die folgenden Fraktionen:

60—70°	Farblose Flüssigkeit	F 2	60
90—100°	Gelbliche Flüssigkeit	F 2	90
	Menge: 1,1 g		

Die höhersiedenden Ester wurden im Hochvakuum bei einem Druck von 0,03 mm destilliert

90—100°	Gelbliches Oel		
	Menge: 3,2 g		
120—125°	Gelbes Oel. Erstarrt kristallin	F 2	120
	Menge: 8,2 g		
125—130°	Gelbliches Oel + Kristalle		
	Menge: 7,1 g		

135—140°	Gelbliches Oel. Erstarrt kristallin	F 2 120
	Menge: 7,1 g	
140—145°	Gelbes Oel. Erstarrt teilweise	
	Menge: 2,1 g	
145°	Zersetzung	
	Dunkelbrauner Rückstand	

In diesen Fraktionen konnten wieder Milchsäure (F 2 60), Bernsteinsäure (F 2 90) und Citronensäure (F 2 120) nachgewiesen werden.

Isolierung der Isocitronensäure

Die Kristalle der Fraktion F 2 135 wurden in Aether aufgenommen, die Lösung mit Tierkohle gekocht, filtriert und eingengt.

Beim Zutropfen von Petroläther erfolgte Trübung und Abscheidung von feinen, farblosen Nadelchen. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Aether-Petroläther lag der Schmelzpunkt der Kristalle bei 104—105°. Mit einer Pincette haben wir die prismenförmigen Kristalle des Citronensäuretrimethylesters herausgelesen und die restlichen Kristallnadeln noch zweimal aus Aether-Petroläther umkristallisiert.

Der Schmelzpunkt der feinen Nadelchen lag nun bei 107° und blieb konstant.

Die Kristallnadeln waren fast unlöslich in Wasser und gaben mit Eisenchlorid eine gelbbraune Färbung.

Bei der Analyse wurden folgende Werte erhalten:

C 47,36 %, H 5,11 %, OCH₃ 30,13 %

Die Formel für die vorliegende Substanz lautet demnach C₆H₄O₄(OCH₃)₂.

Eine durchgeführte Molekulargewichtsbestimmung ergab Mol. Gew. 207, während obige Formel 202 erfordert.

Bei einer Zerewitinoff-Bestimmung erhielten wir 0,365 % aktiven Wasserstoff. Die Rechnung ergibt, dass 0,5 % einem aktiven Wasserstoffatom entsprechen würden.

Wir unterwarfen die Substanz einer Mikrohydrierung. Als Lösungsmittel diente Eisessig, als Katalysator Platin. Es wurde kein Wasserstoff aufgenommen.

Quantitative Verseifung:

39,646 mg Ester wurden mit 10 ccm 0,1 normaler Natronlauge verseift. Die Lösung blieb zwei Tage bei Zimmertemperatur stehen, nachdem anfänglich eine halbe Stunde auf 40° erwärmt worden war.

Nach beendigter Reaktion wurden 10 ccm 0,1 normale Salzsäure zugegeben und mit 0,1 normaler Lauge zurücktitriert. Als Indikator diente Phenolphthalein.

Verbraucht wurden 5,915 ccm Lauge, also $0,5915 \cdot 10^{-3}$ Äquivalente.

Die Einwaage von 39,646 mg Ester entsprach $0,196 \cdot 10^{-3}$ Mol (Molgewicht 202).

Auf ein Mol Ester wurden 3 Äquivalente Lauge verbraucht.

Die neutrale Lösung haben wir mit Salzsäure angesäuert, im Vakuum zur Trockene verdampft und den Rückstand mit abs. Aether extrahiert. Beim Einengen der Aetherlösung blieb ein farbloses Oel zurück, das nach längerem Trocknen im Trockenapparat bei 80° Kristallkeime bildete und schliesslich kristallin erstarrte. Der Schmelzpunkt der Kristalle lag bei 140—144°.

Lacton der Isocitronensäure:

In der Folge wurde 1 g des Esters verseift, die Säure mit Salzsäure freigemacht, die Lösung im Vakuum zur Trockene verdampft und der im Trockenapparat getrocknete gelbliche Rückstand mit 200 ccm abs. Aether ausgekocht. Beim Einengen der Aetherlösung blieb ein fast farbloses Oel zurück. Es wurde in wenig Wasser aufgenommen, die Lösung mit etwas Tierkohle ausgekocht, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Den glasigen Rückstand hat man im Trockenapparat 15 Stunden bei 80° getrocknet, wobei man ein farbloses Kristallpulver erhielt.

In kleinen Portionen konnte das Kristallpulver im Hochvakuum sublimiert werden. Bei einem Druck von 0,002 mm sublimierten bei einer Luftbadtemperatur von 140° farblose Kristallnadeln. Der Schmelzpunkt dieser Nadeln lag bei 159—161°.

Die Analyse ergab:

C 41,10 %, H 3,51 %

Die Werte stimmen für die Formel $C_6H_6O_6$.

Berechnet C 41,38 %, H 3,44 %

Es handelte sich bei dieser Substanz somit um das Lacton der Isocitronensäure.

Diamid des Isocitronensäurelactons:

200 mg Isocitronensäuredimethylester wurden in 6 ccm abs. Alkohol aufgenommen und die Lösung mit trockenem Ammoniak gesättigt. Nach zweitägigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde der Alkohol im Vakuum abgedampft und als Rückstand eine gelbliche Kristallmasse erhalten.

Das Produkt war unlöslich in Petroläther, schwerlöslich in Aether, löslich in Aethanol und in Methanol, gut löslich in Wasser.

Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol erhielten wir farblose Krsitalle, die bei 203—204° schmolzen.

$C_6H_8N_2O_4$ Ber. C 41,85 %, H 4,64 %, N 16,27 %

Gef. C 41,86 %, H 4,69 %, N 16,43 %

Destillationsrückstände aus der Fraktion F

Bei der Destillation der Ester aus den Fraktionen F 1 und F 2 hatte bei einer Temperatur von ungefähr 140° starke Zersetzung eingesetzt.

Die Destillation war bei dieser Temperatur abgebrochen worden. Die dunkelbraunen Rückstände wurden dann zusammengefasst und mit 500 ccm Aether ausgekocht. Beim Einengen dieser Aetherlösung hinterblieb ein braunes Oel, das aromatischen Geruch besass und 1,9 g wog.

Es war löslich in Wasser mit schwach saurer Reaktion und gab mit Eisenchlorid eine schmutziggrüne Farbreaktion. Das Oel liess sich im Hochvakuum bei einem Druck von 0,005 mm destillieren.

160—170° Gelbliches, dickes Oel mit Kristallen

Gibt keine Eisenchloridreaktion

190—200° Gelbbraunes Oel mit aromatischem Geruch

Eisenchlorid: grün —> rot

Aus der bei 160° destillierten Kristallmasse liess sich nach

viermaligem Umkristallisieren aus Aether-Petroläther ein kristallines Produkt isolieren, welches bei 107° schmolz und als Dimethylester des Isocitronensäurelactons identifiziert wurde.

Das bei 190° übergegangene Oel zeigte die typische Farb-reaktion der Brenzcatechinderivate. Mit Eisenchlorid gab es eine dunkelgrüne Farbe, welche bei Zusatz von etwas Soda über Blau nach Rot umschlug.

Es gelang jedoch nicht, aus der geringen Menge ein reines Produkt zu isolieren, vielmehr schien es sich um ein Gemisch mehrerer Substanzen zu handeln.

EXTRAKT III

Die salzsaure, wässrige Lösung wurde in einem 10 Liter Rundkolben im Vakuum eingeengt, wobei das Eindampfen wegen starker Schaumbildung in kleinen Portionen vorgenommen werden musste. Wir erhielten einen braunen, festen Rückstand von 760 g Gewicht. Die Masse wurde im Mörser zerstoßen, mit 1 kg Seesand verrieben und während 14 Tagen im Vakuum bei einem Druck von 30—40 mm mit Butanol extrahiert.

Aus dem braunen Extrakt wurde dann das sich abscheidende Ammonchlorid abgenutscht und im Vakuum das Butanol abdestilliert.

Nach dem Butanol destillierte bei 10 mm Druck und 60—100° eine farblose Flüssigkeit, die wir als Fraktion G bezeichneten.

Die Fraktion G bestand aus einem Gemisch von Butanol und Butanolestern.

Der Rückstand, eine dunkelbraune, zähflüssige Masse mit eigenartigem Geruch, wog 110,5 g.

Wir bezeichnen diese Masse als Fraktion H.

Fraktion H

Eine Probe dieser Masse wurde aus einem Kugelrohr im Hochvakuum destilliert.

70— 90° Farblose Flüssigkeit. Wird nach längerem Stehen
an der Luft rötlich
Hauptmenge

120—130°	Gelbliches Oel mit fettähnlichem Geruch
140—150°	Gelbliches Oel mit fettähnlichem Geruch
150°	Zersetzung

Wie sich bei dieser Destillation zeigte, liess sich nur ein geringer Teil dieser Substanzen destillieren.

Isolierung der Benzoesäure

Die bei 70-90° übergegangene Flüssigkeit wurde nochmals aus einem Kugelrohr destilliert, diesmal bei einem Druck von 10 mm. Nach einem geringen Vorlauf ging die Hauptmenge als farblose Flüssigkeit bei 125—145° über.

Das Destillat war löslich in Aether und Alkohol, schwerer löslich in Wasser mit saurer Reaktion. Mit Eisenchlorid gab es keine Färbung.

Wir nahmen es in Aether auf, kochten mit etwas Tierkohle, filtrierten und engten ein. Beim langsamen Verdunsten der Lösung begannen sich farblose Kristalle abzuscheiden. Sie wurden abgenutscht und zweimal aus verdünntem Alkohol umkristallisiert.

Der Schmelzpunkt lag bei 119°.

Die Analyse ergab:

C 67,02 %, H 5,16 %, OCH_3 — Mol. Gew. 137

Die Kristalle, welche nach den erhaltenen Analysenwerten noch nicht ganz rein schienen, wurden nochmals aus einem kleinen Kugelrohr bei 10 mm Druck sublimiert. Die Hauptmenge sublimierte bei 130—135° als farblose, fettig glänzende Kristalle.

Der Schmelzpunkt lag nun bei 120°.

Schmelzpunkt, Analysenwerte und Sublimationstemperatur deuteten auf Benzoesäure hin.

Ein Mischschmelzpunkt mit Benzoesäure ergab keine Depression.

Veresterung der Fraktion H

Die Fraktion H wurde in heissem Aceton aufgenommen und die filtrierte Lösung in einen 2 Liter Rundkolben gebracht.

Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels haben wir den Rückstand unter Vorschalten eines Trockenapparates im gleichen Rundkolben während 12 Stunden im Vakuum bei 80° getrocknet.

Die trockene Masse wurde mit 1 Liter abs.Methanol und 25 ccm Schwefelsäure 8 Stunden unter Rückfluss erhitzt, nach dem Abkühlen unter Rühren festes Natrium-Bicarbonat bis zur Neutralisation zugegeben und die neutrale Lösung abgenutscht. Das Filtrat hat man im Vakuum auf 200 ccm eingengt und die Ester mit 3,5 Liter Aether aufgenommen. Die braune Aetherlösung wurde filtriert, im Scheidetrichter dreimal mit etwas Wasser ausgeschüttelt, mit Na_2SO_4 getrocknet, nochmals filtriert und eingengt.

Der Rückstand, ein braunes Oel, wog 72,3 g.

Wir haben die Ester aus einem Kugelrohr destilliert. Zuerst bei einem Druck von 12 mm die tiefsiedenden Anteile, dann im Hochvakuum die höhersiedenden Ester.

Unter 12 mm ging zwischen 60 und 130° eine farblose, nach Benzoessäureester riechende Flüssigkeit über. Bei der Destillation im Hochvakuum erhielten wir folgende Fraktionen:

100—105°	Gelbliches Oel. Würziger Geruch	
	Menge: 1,1 g	
115—120°	Gelbliches Oel. Erstarrt zu einem Kristallbrei	H 115
	Schwacher, fettähnlicher Geruch	
	Menge: 7,2 g	
130—135°	Gelbliches Oel. Erstarrt teilweise	H 130
	Menge: 5,5 g	
145°	Gelbliches Oel mit Kristallkeimen	H 145
	Menge: 9,9 g	
160—170°	Gelbliches, dickes Oel	H 160
	Menge: 4,4 g	

Fraktion H 115

Das Oel wurde zwei Tage in den Eisschrank gestellt und anschliessend die ausgeschiedenen Kristalle aus Aether-Petroläther zweimal umkristallisiert.

Wir erhielten farblose Kristalle, die nochmals durch Hochvakuumdestillation gereinigt wurden und deren Schmelzpunkt dann bei 78° lag.

Ein Mischschmelzpunkt mit Citronensäuretrimethylester ergab keine Schmelzpunktdepression.

Fraktion H 130

Aus dieser Fraktion liessen sich durch mehrmaliges Umkristallisieren Kristalle gewinnen, deren Schmelzpunkt bei 107° lag und die als Dimethylester des Isocitronensäurelactons identifiziert wurden.

Fraktion H 145

Nach längerem Aufbewahren im Eisschrank war das Oel zum Teil kristallin erstarrt. Durch mehrmaliges Umkristallisieren liessen sich farblose Kristalle gewinnen: Dimethylester des Isocitronensäurelactons.

Aus den Mutterlaugen konnte keine reine Substanz mehr isoliert werden.

Fraktion H 160

2 g Ester wurden mit 16 ccm 2 normaler Natronlauge zwei Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen, die alkalische Lösung mit Aether ausgeschüttelt und mit Salzsäure angesäuert. Die saure Lösung wurde im Vakuum zur Trockene verdampft und der Rückstand mit 800 ccm Aether ausgekocht. Die ätherische Lösung hinterliess beim Eindampfen ein braunes, dickes Oel mit eigenartigem Geruch. Die wässrige Lösung reagierte sauer und gab mit Eisenchlorid eine gelbbraune Färbung.

Wir versuchten die Säuren im Hochvakuum zu destillieren und erhielten bei einem Druck von 0,005 mm folgende Fraktionen:

130—140° Farbloses Oel in geringer Menge

190—200° Braunes Oel + Kristallnadeln

210° Zersetzung

Die Hauptmenge der Substanz liess sich nicht destillieren.

Ca-Salz der Säure H 160

Wir verseiften nun den Rest der Fraktion H 160 und nahmen die Säuren wie oben in Aether auf. Nach dem Wegdampfen des Aethers wurde das braune Oel 10 Stunden im Trockenapparat bei 80—90° getrocknet.

Die dicke, zähflüssige Masse hat man mit 200 ccm Chloroform ausgekocht, wobei durch das Chloroform eine geringe Menge eines gelben Oels aufgenommen wurde.

Das gelbe Oel besass einen feinen, eigenartigen Geruch und löste sich etwas in Wasser mit saurer Reaktion. Mit Eisenchlorid gab es eine gelbbraune Färbung.

Die in Chloroform nicht lösliche Substanz wurde in Wasser aufgenommen, mit CaCO_3 bis zur Neutralisation versetzt und die Lösung aufgeköcht.

Die wässrige Lösung haben wir im Vakuum eingengt und nach dem Abkühlen etwas Alkohol bis zur Trübung zugefügt. Anschliessend wurde die Lösung zum Sieden erhitzt, wobei sich ein grauer Niederschlag abzuscheiden begann.

Nach 15 Minuten Kochen hat man heiss abgenutscht, die Mutterlauge im Vakuum eingengt, etwas Alkohol zugefügt und wieder zum Sieden erhitzt; dabei erfolgte nochmals eine Abscheidung eines grauen, feinkörnigen Niederschlages.

Die zweite Fraktion des Ca-Salzes wurde zweimal aus siedendem Wasser umkristallisiert und dann im Trockenapparat 10 Stunden bei 80° getrocknet.

Die Analyse des trockenen, weissen Pulvers ergab folgende Werte:

C 24,33 %, H 4,12 %, Ca 19,47 %

Um die Säure zu isolieren wurden 200 mg des Ca-Salzes mit Salzsäure zersetzt, die Lösung im Vakuum zur Trockene verdampft und der Rückstand mit 200 ccm abs. Aether ausgekocht. Nach dem Abdampfen des Aethers blieb ein schwach gelblich gefärbter Sirup zurück.

Wir trockneten ihn im Trockenapparat 12 Stunden bei 80—90°, doch wurde der zähflüssige, dicke Sirup nur zu einem kleinen Teil kristallin.

Eine weitere Reinigung dieser Säure war wegen der geringen Substanzmenge nicht möglich.

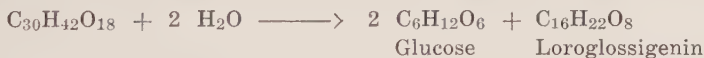
Über Loroglossin

THEORETISCHER TEIL

In Orchideen entdeckten *E. Bourgelot* und *M. Bridel*¹² vor längerer Zeit ein Glucosid Loroglossin. Es findet sich in den oberirdischen Organen zahlreicher Orchideenarten¹³, aber stets in kleiner Menge und ist daher relativ schwer zugänglich.

Aus 40 kg frischem Pflanzenmaterial, für welches wir Herrn Professor *A. U. Däniker* (Zürich) zu grossem Dank verpflichtet sind und das im wesentlichen aus den oberirdischen Teilen von *Orchis latifolia*, *Orchis mascula* und *Orchis masculata* bestand, gelang es uns, nach der Methode von *Delauney*¹⁴ ca. 2,2 g kristallisiertes Loroglossin zu gewinnen. Die Kristallisation des Glucosids ist langwierig und erfordert monatelange Zeit.

Dem Loroglossin wird von früheren Bearbeitern die Formel $C_{30}H_{42}O_{18}$ zuerteilt. Seine Hydrolyse soll nach der Gleichung



vollziehen. Der Sinterungspunkt des Glucosids wird mit 133,5° (korr.), der Schmelzpunkt mit 143,5° (korr.) angegeben.

Wir stellten in unseren gut kristallisierten Präparaten fest, dass sie etwas Methoxyl (ca. 3 %) enthielten. Da dieser Methoxylgehalt auf die Beimengung einer Methoxyl-haltigen Substanz zurückgehen musste, wurde die Verbindung durch weitere Kristallisation gereinigt, bis nur noch Spuren von Methoxyl nachweisbar waren. Diese Reinigung ist verlustreich. Solche Präparate zeigten folgende Zusammensetzung:

C 53,11 %, H 6,25 %

Die Verhältnisformel $(C_7H_{10}O_4)_x$ verlangt C 53,16 H 6,33%. Während unser Wasserstoffwert mit dem von *P. Delauney*

gefundenen übereinstimmt, liegt unser C-Wert ca. 1 % höher.

Unser Präparat sinterte bei 136° und war bei 149—151° (unkorr.) geschmolzen.

Obwohl wir vom Löröglossin bisher keine guten Molekulargewichtsbestimmungen ausführen konnten, erscheint es uns wahrscheinlich, dass die Molekularformel des Löröglossins $C_{14}H_{20}O_8$ bzw. $C_8H_9O_3 \cdot C_6H_{11}O_5$ ist. Dafür sprechen die Analysen gut kristallisierter Tetraacetyl-, Tetrabenzoyl- und Tetra-(p-nitrobenzoyl)-Derivate, die sich aus dem Glucosid herstellen liessen.

Das Tetrabenzoylderivat, Smp. 117—118° ergab:



Ber.	C 68,84 %	H 4,91 %
Gef.	C 69,05 %	H 5,09 %

Die Tetra-(p-nitrobenzoyl)-Verbindung, Smp. 154°, hatte die Zusammensetzung:



Ber.	C 55,26 %	H 3,51 %	N 6,14 %
Gef.	C 55,64 %	H 3,68 %	N 6,38 %

Nach unserer Auffassung handelt es sich somit beim Löröglossin um ein Mono- und nicht um ein Di-Glucosid.

Da Löröglossin durch Hydrolyse mit Emulsin nur teilweise in Zucker und Aglucon gespalten wird¹², versuchten wir, es durch die im Hepato-Pankreassaft der Weinbergschnecke vorkommenden Enzyme zu zerlegen. Es wird von diesen leicht hydrolysiert. Die nach 3 Tagen abgespaltene Glucosemenge betrug 84,4 % der Theorie, wenn man der Hydrolyse folgende hypothetische Gleichung zugrunde legt:



Leider gelang es uns mit der Substanz, die wir für diese Versuche einsetzen konnten, nicht, das Aglucon rein zu fassen.

Bei der katalytischen Hydrierung des Löröglossins in Wasser mit Platinoxid und Wasserstoff wurden pro Mol des Glucosids (Mol. Gew. 316) 3,5—3,7 Mol H_2 aufgenommen. Ein Teil dieses Wasserstoffs dient zur reduktiven Abspaltung des Zucker-

restes. Dieser geht dabei in d-Sorbit über, der sich als Dibenzal-sorbit und Hexaacetylsorbit isolieren liess.

Loroglossin reagiert nicht mit Hydroxylamin. Es zeigt auch die für Furanverbindungen charakteristischen Farbreaktionen nicht.

Bei der polarographischen Untersuchung liessen sich keine Stufen erkennen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Isolierung von Loroglossin

Die Isolierung des Glucosids erfolgte in der von *Delauney* angegebenen Weise. Die hier angeführten Zahlen beziehen sich auf die Aufarbeitung von 10 kg frischen Pflanzen.

Wir kochten das zerkleinerte Pflanzenmaterial zweimal mit je 50 Liter 85prozentigem Alkohol unter Zusatz von CaCO_3 aus. Der bräunlichgrüne, alkoholische Extrakt wurde im Vakuum eingedampft, wobei sich ein Rückstand von ca. 300 g ergab, eine braune Masse von heuartigem Geruch. Sie wurde in 300 ccm heissem Wasser aufgenommen, mit 3 Liter 90prozentigem Alkohol versetzt, die Lösung von dem ausfallenden Niederschlag abfiltriert und 15 Minuten unter Rückfluss erhitzt. Nach 24 Stunden haben wir den gebildeten Schlamm abgenutscht und die rotbraune Lösung unter Zugabe von CaCO_3 im Vakuum zur Trockene verdampft.

Der Rückstand wurde mit Seesand und CaCO_3 verrieben und 10—12 mal mit je 5 l wasserhaltigem Essigester ausgekocht. Jede Extraktion dauerte ca. $\frac{3}{4}$ Stunden. Die gelbgrün gefärbten Essigesterlösungen hat man im Vakuum unter Zusatz von CaCO_3 eingeeengt.

Der bräunliche Rückstand wurde mit 150 ccm warmem Wasser aufgenommen, die erkaltete Lösung im Scheidetrichter mit Aether ausgeschüttelt und von der dunkelolivegrünen Aetherlösung abgetrennt. Hierauf haben wir die wässrige Lösung

im Vakuum zur Trockene eingeengt und den Rückstand mit ca. 500 ccm heissem Alkohol aufgenommen. Nach 24 Stunden wurde die braune, alkoholische Lösung filtriert und zum Filtrat 250 ccm absoluter Aether zugegeben. Wir liessen sie 24 Stunden im Eisschrank stehen, dekantierten von dem amorphen Niederschlag ab, versetzten die klare Lösung erneut mit 1200 ccm absolutem Aether und dekantierten nach 24stündigem Stehen nochmals. Aus der so erhaltenen Lösung schieden sich nach 2—3tägigem Aufbewahren im Eisschrank feine Kristalldrusen ab.

Die durch anhaftendes Oel noch stark verunreinigten Kristalle kristallisierten wir zuerst aus Aceton und dann mehrmals aus Alkohol um.

Das Glucosid schied sich in feinen Nadelchen ab und schmolz bei 149—151°.

Hydrolyse des Loroglossins

Da *Delauney* mit Emulsin nur eine unvollständige Spaltung des Glucosids erreicht hatte (41,66 %), versuchten wir, das Loroglossin mit Hilfe von Schneckenferment zu spalten.

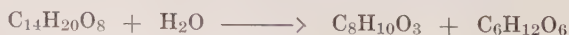
Wir versetzten eine wässrige Lösung des Glucosids mit Hepatopankreassaft der Weinbergschnecke und bestimmten nach einer gewissen Zeit den Zuckergehalt der Lösung nach der Methode von Bertrand.

In unserem Versuch lösten wir 49,916 mg Loroglossin in ca. 5 ccm Wasser und versetzten die Lösung mit 1 ccm Schneckenferment. Die braune, klare Lösung wurde 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschliessend 24 Stunden im Brutschrank bei einer Temperatur von 30° aufbewahrt.

Nach dieser Zeit hatte sich die Lösung stark getrübt und ein weissgrauer Bodensatz gebildet.

Wir entnahmen dann der Lösung, deren Gesamtgewicht 6,6456 g betrug, zur Bestimmung des Zuckergehaltes 2,0314 g Flüssigkeit. Diese enthielt 15,25 mg Loroglossin und 0,305 ccm Ferment.

Wenn sich die Glucosidspaltung nach der Gleichung



vollzieht, müssten bei vollständiger Hydrolyse 8,69 mg Glucose gebildet werden.

Wir fanden 7,85 mg Glucose, wovon 0,52 mg als Reduktionsanteil des Fermentes zu subtrahieren sind.

Die 7,33 mg Glucose entsprechen daher einer Hydrolyse von 84,4 %.

Isolierung des Aglucons

Die Hydrolyse wurde mit 200 mg Loroglossin wiederholt, das man während 4 Tagen der Einwirkung des Schneckenfermentes aussetzte. Anschliessend schüttelten wir die wässrige Lösung dreimal mit Aether aus und engten die filtrierte Aetherlösung im Vakuum ein. Wir erhielten als Rückstand eine harzige, gelbe Masse, die man in Chloroform aufnahm, wobei ein Teil des Harzes ungelöst zurückblieb. Die Chloroformlösung wurde im Vakuum eingengt und das zurückbleibende Oel in Aether gelöst. Beim Einengen der Aetherlösung blieb ein öliges Rückstand, in dem sich winzige Kristallkeime bildeten.

Auch durch wiederholtes Aufnehmen in Aether und Chloroform liess sich die Substanz nicht in reinen Kristallen gewinnen.

Erst nach mehrwöchigem Stehen kristallisierte die Masse teilweise durch, wobei sich gelbliche, blattförmige Kristalle bildeten.

Die Kristalle besaßen einen angenehmen Geruch nach frischem Heu und gaben mit Eisenchlorid eine schwache, violette Farbreaktion. Die erhaltene Substanzmenge war sehr gering und noch nicht rein.

Löslichkeit, Geruch und Eisenchloridreaktion stimmten mit den von *Delauney* gemachten Angaben überein.

Hydrierung des Loroglossins

Die Mikrohydrierung wurde in wässriger Lösung durchgeführt. Als Katalysator verwendeten wir Platin.

Die Substanz nahm rasch Wasserstoff auf und nach 1½ Stunden war die Hydrierung beendet. Zur Berechnung des aufgenommenen Wasserstoffs wurde als Mol.-Gewicht des Loroglossins 316, entsprechend der Formel $C_{14}H_{20}O_8$, angenommen.

9,80 mg Loroglossin nahmen 2,542 ccm H_2 auf (0° , 760 mm), entsprechend 3,64 Mol H_2 auf 1 Mol Loroglossin.

Bei der Hydrierung des Loroglossins in präparativem Massstab haben wir 200 mg des Glucosids in 30 ccm Wasser mit 50 mg Platinoxid und Wasserstoff reduziert. Nach 3 Stunden war die Wasserstoffaufnahme beendet. Die vom Platin abfiltrierte Flüssigkeit wurde im Vakuum zur Trockene gebracht, der farblose, halbfeste Rückstand mit 200 ccm Aether ausgekocht und der Aether-Extrakt eingedampft. Der zurückgebliebene Rückstand besass angenehmen Geruch, war schwer löslich in Wasser, aber leicht löslich in Aceton, Aether, Petroläther und Chloroform. Seine Kristallisation gelang bisher nicht.

Der in Aether nicht lösliche Anteil des Reaktionsproduktes wurde mit einigen Tropfen Wasser zu einem Sirup angerührt und 1 ccm 50prozentige Schwefelsäure sowie 0,2 g Benzaldehyd zugefügt. Nachdem dieses Gemisch 2 Stunden auf der Schüttelmaschine geschüttelt worden war, haben wir es mit 100 ccm Wasser verdünnt, den Niederschlag abzentrifugiert und mit Alkohol und Aether gewaschen. Das farblose Produkt schmolz bei 161° und gab mit Dibenzal-sorbit keine Schmelzpunktserniedrigung.

In der vom Dibenzal-sorbit abgetrennten wässerigen Lösung haben wir die SO_4 -Ionen mit Bariumhydroxydlösung quantitativ gefällt, $BaSO_4$ abfiltriert, das Filtrat eingedampft, getrocknet und hierauf in 2 ccm trockenem Pyridin und 0,3 ccm Essigsäureanhydrid aufgenommen. Nach 24stündigem Stehen wurde das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Es blieb ein in Wasser unlösliches, in Aether leicht lösliches Oel zurück. Dieses wurde mit Aether extrahiert und hierauf im Hochvakuum (0,04 mm) in einer Kugelhöhre destilliert. Nach einigen Tropfen Vorlauf ging bei 155° (Luftbadtemperatur) ein Oel über, das innerhalb 24 Stunden kristallin erstarrte. Die Kristalle schmolzen bei 97° . Ein zu Vergleichszwecken hergestelltes Präparat von Hexaacetyl-sorbit zeigte den Smp. 98° . Mischschmelzpunkt der beiden Präparate $97-98^\circ$.

In dem aus Loroglossin bei der katalytischen Reduktion erhaltenen Zuckerderivat handelt es sich um d-Sorbit.

Loroglossin-tetraacetat

100 mg Loroglossin wurden in 8 ccm wasserfreiem Pyridin gelöst und mit 0,5 ccm Essigsäureanhydrid versetzt. Die sich gelbbraun färbende Lösung liessen wir unter Ausschluss von Feuchtigkeit 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen und engten sie dann im Vakuum ein. Der Rückstand, ein braunes, zähflüssiges Oel, wurde in Aether gelöst, filtriert und mit wenig verdünnter Salzsäure geschüttelt. Dann hat man die Aetherlösung dreimal mit Wasser gewaschen und den Aether abdestilliert. Wir erhielten so eine halbfeste, gelbliche Masse, die sich leicht in Aether löste und in Petroläther schwer löslich war.

Es wurde versucht, die Substanz aus einem Gemisch von Aether und Petroläther umzukristallisieren, was aber erst gelang, nachdem die Lösung mit festem Kohlenoxyd stark gekühlt worden war. Nachdem sich beim Abkühlen ein farbloser Stoff abgeschieden hatte, wurde die überstehende Lösung vorsichtig abdekantiert, etwas eingengt und nochmals gekühlt. So erhielten wir 2 Fraktionen, die man im Trockenapparat bei 60° trocknete.

Fraktion I Smp. 81—90°

Fraktion II Smp. 83—91°

$C_{22}H_{26}O_{12}$

Ber.	C 54,52 %	H 5,82 %
Gef.	C 54,95 %	H 6,05 %

Loroglossin-tetrabenzoat

100 mg Loroglossin wurden in 10 ccm wasserfreiem Pyridin gelöst und mit 0,3 ccm Benzoylchlorid versetzt. Die Lösung färbte sich rasch rot, wobei sich Pyridin-hydrochlorid in farblosen Kristallen abschied. Nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur unter Ausschluss von Feuchtigkeit wurde die Lösung mit 30 ccm Aether versetzt, filtriert und mit Hydrogencarbonatlösung, dann mit verdünnter Salzsäure ausgeschüttelt. Wir wuschen die Aetherlösung noch dreimal mit Wasser und engten sie ein.

Der gelbbraune, ölige Rückstand erstarrte beim Stehen über Nacht teilweise zu einer gelblichen Kristallmasse, welche leicht

löslich war in Aether, weniger löslich in Aceton, Chloroform, Alkohol, schwer löslich in Petroläther.

Das den Kristallen anhaftende Oel war in Aether schwerer löslich als die Kristalle. Wir nahmen daher die Kristalle in Aether auf, kochten mit etwas Tierkohle, filtrierten und erhielten nach dem Einengen eine feste Substanz. Zum Umkristallisieren lösten wir sie in wenig Aether und fügten Petroläther bis zur Trübung zu. Beim Abkühlen mit festem CO_2 schieden sich gelbliche Kristalle ab, die nach dem Trocknen bei $117\text{--}118^\circ$ schmolzen. Die Mutterlauge wurde nochmals mit Petroläther versetzt und bei Zimmertemperatur langsam eingedunstet.

Nach drei Tagen hatten sich fast farblose, quaderförmige Kristalle abgeschieden. Ihr Schmelzpunkt lag ebenfalls bei $117\text{--}118^\circ$.



Ber.	C 68,82 0/0	H 4,95 0/0
Gef.	C 69,05 0/0	H 5,09 0/0

Loroglossin-tetranitrobenzoat

150 mg Loroglossin wurden in 10 ccm wasserfreiem Pyridin gelöst und die Lösung mit 450 mg p-Nitrobenzoylchlorid versetzt. Hierauf erwärmten wir sie zwei Stunden auf 60° und liessen sie drei Tage unter Feuchtigkeitsausschluss bei Zimmertemperatur stehen, worauf sich farblose, zu Büscheln vereinigte Kristallnadeln abgeschieden hatten. Beim Zugiessen von 50 ccm Wasser erfolgte eine weitere Abscheidung von Kristallnadeln.

Die Kristalle, die sich auch in Aether nur sehr schwer lösten, wurden abgenutscht und mit Natriumhydrogencarbonatlösung, dann mit Wasser gewaschen. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Alkohol schmolzen sie bei 154° .



Ber.	C 55,25 0/0	H 3,53 0/0	N 6,14 0/0
Gef.	C 55,64 0/0	H 3,68 0/0	N 6,38 0/0

LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ J. de Pharm. et de Ch. 7, 294 (1845).
- ² Bull. Sciences pharm. 35, 345 (1928).
- ³ Bull. Sciences pharm. 35, 689 (1928).
- ⁴ J. de Ph. et Ch. 13, 379 (1827).
- ⁵ Bul. Soc. Chim. de Paris 1929 I 776.
- ⁶ J. Am. Pharm. Association 21, 856 (1932).
- ⁷ Rec. Trav. Chim. 37, 16.
- ⁸ Am. Soc. 47, 568 (1925); 52, 2928 (1930); 57, 1725 (1935).
- ⁹ Am. Soc. 59, 2499 (1937).
- ¹⁰ Chemical abstracts 1938, 973.
- ¹¹ J. Biol. Ch. 145, 511.
- ¹² C. r. 168, 701 (1919).
- ¹³ C. r. 171, 435 (1920); 176, 598 (1923).
C. r. 180, 224 (1925); 180, 1770 (1925).
- ¹⁴ Contribution à l'étude des Glucosides de la famille des Orchidées.
Diss. Paris (1924).

INHALTSVERZEICHNIS

SÄUREN AUS DIGITALIS-EXTRAKT

Theoretischer Teil:

Bisherige Forschungen	7
Ergebnisse eigener Untersuchungen	9
Aufarbeitungsschema	13

Experimenteller Teil:

Extrakt 1	
Isolierung der Bernsteinsäure	15
Neutrale Substanzen	16
Phenole	17
Isolierung der Kaffeesäure	17
Ameisensäure, Essigsäure	18
Säure C 85	20
Extrakt 2	
Fraktion F 1	23
Isolierung der Milchsäure	24
Isolierung der Citronensäure	26
Fraktion F 2	26
Isolierung der Isocitronensäure	27
Extrakt 3	
Isolierung der Benzoesäure	31

UEBER LOROGLOSSIN

<i>Theoretischer Teil:</i>	35
----------------------------	----

Experimenteller Teil:

Isolierung von Loroglossin	37
Hydrolyse des Loroglossins	38
Isolierung des Aglucons	39
Hydrierung	39
Loroglossin-tetraacetat	41
Loroglossin-tetranitrobenzoat	41
Loroglossin-tetranitrobenzoat	42

<i>Literatur</i>	43
------------------	----

CURRICULUM VITAE

Ich, Erich Matter, Bürger von Köllikon (Aargau), wurde am 6. Januar 1918 in Menziken geboren.

Nach Besuch der Primarschule in Liestal, der Sekundarschule in Ermatingen, trat ich in die Oberrealabteilung der Kantonschule Frauenfeld ein, wo ich die Maturitätsprüfung bestand.

Im Wintersemester 1938 begann ich mein Studium an der Universität Zürich. Ich wollte zuerst Medizin studieren, entschloss mich dann aber für das Studium der Chemie. Mein Studium wurde während des Krieges durch Aktivdienst häufig unterbrochen.

Ich bestand die Examen in Mathematik, Zoologie und Physik und begann im Herbst 1944 mit meiner Dissertationsarbeit unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Paul Karrer.

Auf 1. Oktober 1945 wurde ich von Herrn Professor Karrer zum Vorlesungsassistenten ernannt und übte dieses Amt während vier Semestern aus.

